I449788

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I449788 B**

(45)公告日： 中華民國 103 (2014) 年 08 月 21 日

(21)申請案號：098107048 (22)申請日： 中華民國 98 (2009) 年 03 月 03 日

(51)Int. Cl.： *C12N15/87 (2006.01)*

(30)優先權：2008/03/03 美國 61/067,910

(71)申請人：艾伯維有限公司 (美國) ABBVIE INC. (US)
美國

(72)發明人：辛瓊明 HSIEH, CHUNG-MING (US)；包克 強納森P BELK, JONATHAN P. (US)；沛芮茲 珍妮佛M PEREZ, JENNIFER M. (US)；畢納托 羅倫洛 BENATUIL, LORENZO (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

Suga M et al., "High-efficiency electroporation by freezing intact yeast cells with addition of calcium", Current Genetics, Vol.43, No.3, P.206-211, 2003/04/09

Colby DW et al., "Engineering Antibody Affinity by Yeast Surface Display", Methods in Enzymology, Vol.388, P.348-358, 2004

Helmuth M et al., "An Electrotransfection Protocol for Yeast Two-Hybrid Library Screening", Analytical Biochemistry, Vol.293, No.1, P.149-152, 2001/04/23

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：4 共 0 頁

(54)名稱

轉型酵母菌之方法

METHODS FOR TRANSFORMING YEAST

(57)摘要

本發明係關於一種藉電穿孔轉型之酵母菌及其突變體，此產生表現重組產物之穩定的經轉型酵母菌宿主細胞。本發明亦係關於經轉型酵母菌細胞及集合庫。

This invention is directed to the transformation of yeast, and mutants thereof, by electroporation, which result in stably transformed yeast host cells that express recombinant products. This invention also is directed to transformed yeast cells and libraries.

(無元件符號說明)

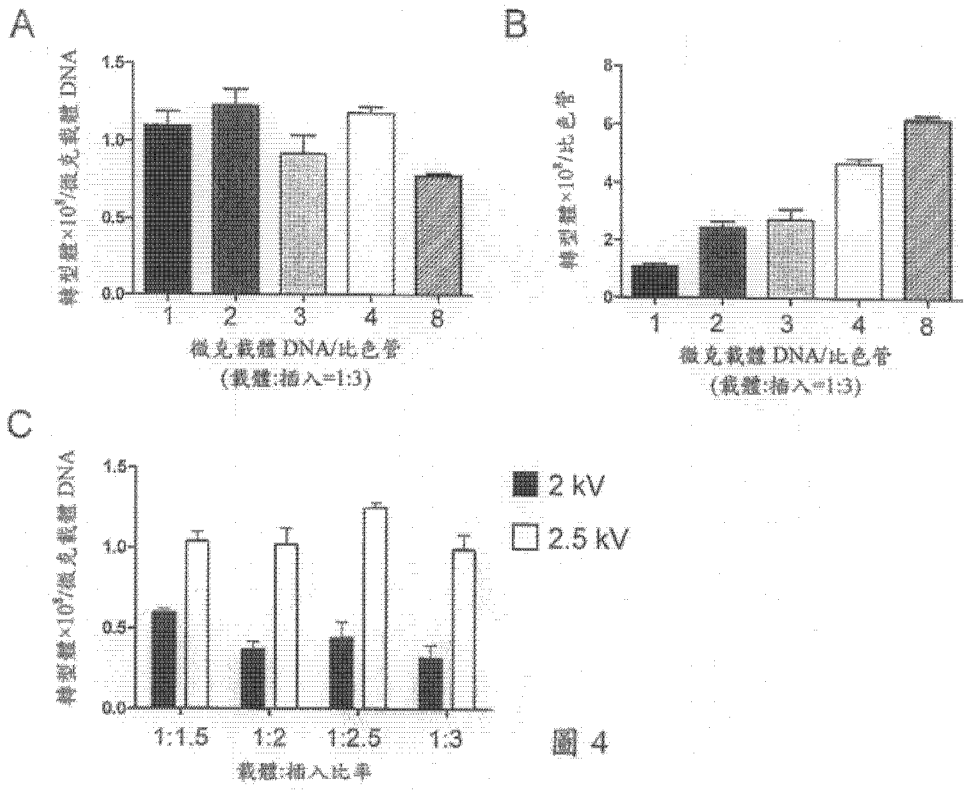

A
轉型體×10⁵/微克載體 DNA
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3
4
8
微克載體 DNA/比色管
(載體:插入=1:3)
B
轉型體×10⁵/比色管
8
6
4
2
0
1
2
3
4
8
微克載體 DNA/比色管
(載體:插入=1:3)
C
轉型體×10⁵/微克載體 DNA
1.5
1.0
0.5
0.0
1:1.5
1:2
1:2.5
1:3
載體:插入比率
2 kV
2.5 kV

圖 4

發明專利說明書

公告本

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：98107048

※ 申請日： 98.3.03 ※IPC 分類：C12N 15/87 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

轉型酵母菌之方法

METHODS FOR TRANSFORMING YEAST

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種藉電穿孔轉型之酵母菌及其突變體，此產生表現重組產物之穩定的經轉型酵母菌宿主細胞。本發明亦係關於經轉型酵母菌細胞及集合庫。

三、英文發明摘要：

This invention is directed to the transformation of yeast, and mutants thereof, by electroporation, which result in stably transformed yeast host cells that express recombinant products. This invention also is directed to transformed yeast cells and libraries.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 4 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於酵母菌轉型及藉此轉型之酵母菌細胞及酵母菌細胞集合庫之領域，以及由此產生重組產物。更具體而言，本發明係關於藉由電穿孔轉型酵母菌。

【先前技術】

藉助活體內動物免疫或藉由活體外重組抗體展示技術所產生之治療抗體已成功地用於臨床且因此亦已證實該等技術可作為有效的藥物發現技術。儘管通常預期得自動物免疫之單株抗體具有足夠高的親和性以達成治療功效，但由動物免疫研發治療抗體需要使非人類抗體人類化或獲得表現人類抗體之轉基因動物。藉由活體外展示技術(噬菌體、細菌、酵母菌、哺乳動物細胞及核糖體展示)自預先建立的抗體集合庫直接選擇完全人類抗體(Chao, G.等人，(2006) *Nat. Protoc.* 1:755-68；Gai, S. A.及Wittrup, K. D. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17:467-73；Griffiths, A. D. 等人，(1994) *EMBO J.* 13:3245-60；He, M.及Khan, F. (2005) *Expert Rev. Proteomics* 2:421-30；Hoogenboom, H. R. (2002) *Methods Mol. Biol.* 178:1-37；Hoogenboom, H. R. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1105-16)提供有價值的類似方法，且在靶抗原不能引起活體內產生性免疫響應之情況下可成為最佳替代製程。

業內已設計了人類抗體集合庫來展示全長抗體或各種抗體片段，例如Fab、scFv及dAb。該等集合庫通常係藉由在

另外引入或不引入合成多樣性之情況下自B細胞庫獲得抗體多樣性且將其轉移至集合庫中(Hoet, R. M.等人，(2005) *Nat. Biotechnol.* 23:344-8)、或者藉由在有限人類抗體框架中以合成方式使CDR殘基隨機化(Rothe, C.等人，(2008) *J. Mol. Biol.* 376:1182-200)來構建。由於抗體重鏈及輕鏈係分別擴增並重格式化為集合庫展示格式，因此在該過程期間形成VH與VL之間之新配對。儘管此VH-VL改組容許產生新抗原結合位點，但其亦可極為顯著地增加理論集合庫多樣性。業內已研發出數種策略藉由降低在集合庫中有效採樣所需之理論集合庫多樣性及實際集合庫容量來設計更好且更具產生性的抗體集合庫。該等策略包含巧妙地設計由多樣性較低但可能反應性更強的B細胞庫產生之合成或半合成集合庫(Rothe, C.等人，(2008) *J. Mol. Biol.* 376:1182-200)及免疫集合庫(Hoet, R. M.等人，(2005) *Nat. Biotechnol.* 23:344-8)或假免疫集合庫(Lee, H. W.等人，(2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346:896-903)。儘管該等方法可有效地將理論集合庫多樣性顯著降低數個或甚至更多個對數數量級，但業內一直需要較大集合庫容量及產生其之方法來完善集合庫設計以增大確定抗體吻合之幾率，而不管該等抗體之多少。

相對於使用原核系統(例如大腸桿菌(*E. coli*))，使用在真核系統(例如酵母菌)中產生核酸集合庫及由此所產生之重組產物(例如醫藥蛋白質)之方式可提供顯著優點。酵母菌通常可生長至比細菌高的細胞密度，且容易適應連續的

發酵處理。然而，作為宿主/載體系統用於產生重組產物及集合庫之酵母菌物種之研發嚴重受限於關於以下之知識的缺乏：轉型條件及將外來核酸穩定地引入酵母菌宿主細胞中之適宜方式。

在各種電學及生物學參數中，細胞表面之DNA吸附尤其有助於細胞電轉型。低強度的交流電場亦促進DNA轉移至大腸桿菌細菌中，據推測其係藉由電刺激DNA通透酶來達成。業內已積累了許多聚電解質DNA對電穿孔基因轉移之主要電擴散或電泳效應的證據。業內亦報導電穿孔有利於電滲透效應及膜內陷。

跨越酵母菌細胞膜施加之電場可導致產生對電穿孔過程至關重要之瞬間孔。電穿孔儀信號發生儀提供跨越電極間隙(以公分表示)的電壓(以kV表示)。該電位差定義稱為電場強度者，其中E等於kV/公分。每個細胞對於最佳電穿孔皆具有其自身臨界場強度。此係由於細胞尺寸、膜組成及細胞壁自身之各種特性所致。舉例而言，哺乳動物細胞通常需介於0.5-5.0 kV/公分之間之場強度來引發細胞死亡及/或電穿孔。通常，所需場強度與細胞尺寸成反比變化。

轉型方法

1.藉由電穿孔轉型

Becker等人，(Methods in Enzymology 194: 182-187 (1991))揭示酵母菌啤酒酵母菌*(Saccharomyces cerevisiae)(S. cerevisiae)*之轉型方法。Becker亦揭示原生質球轉型。

Faber等人，(Curr. Genet. 25: 305-310 (1994))揭示甲醇

營養型酵母菌*多形漢遜酵母菌(Hansenula polymorpha)*之轉型方法。Faber亦將該方法應用於*甲醇畢赤酵母(Pichia methanolica)*。

Helmuth等人，(Analytical Biochem. 293:149-152 (2001))揭示藉由使LiAc與DTT預處理組合來提高酵母菌轉型效率。

Kasutske等人，(Yeast 8: 691-697 (1992))揭示藉由不同同源載體質粒電脈衝轉型完整*麥芽糖假絲酵母(Candida maltosa)*細胞。

Meilhoc等人，(Bio/Technology 8: 223-227 (1990))揭示使用完整啤酒酵母菌細胞及電場脈衝之轉型系統。

Neumann等人，(1996) Biophys. J. (1996) 71:868-877揭示藉由電穿孔及鈣介導DNA吸附實施之酵母菌細胞轉型的動力學。

Piredda等人，(Yeast 10: 1601-1612 (1994))揭示酵母菌奧默畢赤酵母菌(*Yamadazyma (Pichia) ohmeri*)之轉型系統。

Scorer等人，(Bio/Technology 12: 181-184 (1994))揭示*巴斯德畢赤酵母菌(P. pastoris)*載體，其容許快速G418選擇使用電穿孔及原生質球轉型系統在*巴斯德畢赤酵母菌*中表現之稀少高複本數轉型體。

Sherman等人，(Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics, 第91-102頁, Cold Spring Harbor Laboratory (1986))揭示酵母菌突變體LEU2及HIS3之轉

型。

Suga及Hatakeyama(Curr. Genet. 43:206-211 (2003))揭示在實施添加鈣之電穿孔前產生感受態細胞之冷凍方法。

Thompson等人，(Yeast 14:565-571 (1998))揭示製備酵母菌細胞(例如啤酒酵母菌及*白色念珠菌(Candida albicans)*以供藉由電穿孔轉型。

Yang等人，(Applied and Environmental Microbiology 60(12): 4245-4254 (1994))揭示*樹幹畢赤氏酵母(Pichia stipitis)*基於其URA3基因及同源自主複製序列ARS2之電穿孔。

頒予Raymond之美國專利第5,716,808號揭示使用電穿孔製備含外來DNA構成體之*甲醇畢赤酵母*細胞的方法，及在*甲醇畢赤酵母*細胞中產生外來肽之方法。

頒予Abbas之美國專利第7,009,045號揭示藉由電穿孔及藉由原生質球轉型實施之產黃素(flavinogenic)酵母菌*季也蒙畢赤酵母(Pichia guilliermondii)*及*著明假絲酵母(Candida famata)*的轉型。

2.藉由原生質球形成而轉型

Becker等人，(Methods in Enzymology 194: 182-187 (1991))揭示酵母菌啤酒酵母菌轉型以及原生質球轉型之方法。

Scorer等人，(Bio/Technology 12: 181-184 (1994))揭示*巴斯德畢赤酵母菌*載體，其容許G418選擇使用電穿孔及原生質球轉型系統在*巴斯德畢赤酵母菌*中表現之稀少高複本

數轉型體。

頒予Stroman等人之美國專利第4,808,537號揭示使用原生質球轉型自*巴斯德畢赤酵母菌*及用於甲醇調節表現異源基因之調節區域分離及選殖甲醇可誘導基因之方法。

頒予Cregg等人之美國專利第4,837,148號揭示能將質粒作為染色體外因子保持在*畢赤氏酵母*之宿主菌株中之自主複製序列。該專利另外揭示包含DNA序列之構成體以及藉由原生質球形成所產生之經轉型生物體，且提供產生本發明DNA序列及構成體之方法以及自任一來源分離該等序列之方法。

頒予Stroman等人之美國專利第4,855,231號揭示對甲醇、分解代謝物非抑制性碳源及碳源饑餓之存在具有反應性之DNA序列。第'231號專利證實*巴斯德畢赤酵母菌*之原生質球轉型。

頒予Stroman等人之美國專利第4,879,231號揭示酵母菌(例如*巴斯德畢赤酵母菌*)之原生質球轉型方法。

頒予Cregg等人之美國專利第4,882,279號揭示*畢赤氏酵母*屬之酵母菌(例如，*巴斯德畢赤酵母菌*)的原生質球轉型技術。

頒予Cregg之美國專利第5,135,868號係關於*畢赤氏酵母*屬酵母菌之位點特異性基因組修飾的方法。第'868號專利使用原生質球轉型方法。

頒予Buckholz之美國專利第5,268,273號係關於*巴斯德畢赤酵母菌*之原生質球轉型方法。

頒予Raymond之美國專利第5,736,383號係關於*畢赤氏酵母屬*之酵母菌株、具體而言*甲醇畢赤酵母*的轉型方法。第'383號專利另外係關於*畢赤氏酵母屬*之酵母菌的原生質球轉型方法以及藉由電穿孔之轉型方法。

3.其他轉型系統

Kunze等人，(Current Genetics 9(3): 205-209 (1985))揭示用質粒pYe(ARG4)411轉型啤酒酵母菌、*麥芽糖假絲酵母菌及季也蒙畢赤酵母菌G266*之方法，該質粒含有插入pBR322中之啤酒酵母菌ARG4基因。Kunze在轉型方法中使用$CaCl_2$。

Kunze等人，(J. Basic Microbiol. 25(2): 141-144 (1985))揭示工業上重要的酵母菌*麥芽糖假絲酵母菌及季也蒙畢赤酵母菌*G266之使用$CaCl_2$之轉型方法。

Kunze等人，(Acta Biotechnol. 6(1): 28 (1986))揭示工業上重要的酵母菌*麥芽糖假絲酵母菌及季也蒙畢赤酵母菌*之轉型。

Neistat等人，(Mol. Ge. Mikrobiol. Virusol. 12: 19-23 (1986))(僅摘要)揭示酵母菌*多形漢遜酵母菌、季也蒙畢赤酵母菌、土星擬威爾酵母菌(Williopsis saturnus)*之使用具有啤酒酵母菌ADE2基因之質粒的轉型。但其未揭示轉型方法。

頒予Cregg等人之美國專利第4,929,555號揭示使*畢赤氏酵母菌*屬甲醇營養型物種的完整細胞對藉由DNA轉型具有感受性之方法，以及用DNA使此等物種(具體而言*巴斯德*

畢赤酵母菌)之完整細胞轉型之方法。

頒予Heefner等人之美國專利第5,231,007號揭示產生及分離*著明假絲酵母*之高產黃素菌株的方法，其以約7.0-7.5克/升/6天之產率產生核黃素。該方法包含在親代菌株及子代菌株上實施反覆誘變處理步驟及原生質體融合步驟之組合，該等子代菌株係在每個步驟後根據篩選製程來選擇。

4.載體、ARS因子及基因集合庫

Clyne, R. K.等人，(EMBO J. 14(24): 6348-6357 (1995))係關於裂殖酵母菌*粟酒裂殖酵母菌*(*Schizosaccharomyces pombe*)之ARS1(ARS因子)的精細結構分析。一系列嵌套缺失突變之特徵表明，包含ARS1之最小DNA片段亦係較大片段，此乃因小於650 bp之片段皆未保留顯著ARS活性。

Liauta-Teglivets, O.等人，(Yeast 11(10): 945-952 (1995))揭示自*季也蒙畢赤酵母菌*基因組集合庫選殖核黃素生物合成中所涉及之GTP-環水解酶的結構基因。

Cannon, R. D.等人，(Mol. Gen. Genet. 221(2): 210-218 (1990))揭示在*白色念珠菌*及啤酒酵母菌中起作用之自主複製序列(ARS)因子的分離及核苷酸序列。

Takagi, M等人，(J. Bacteriol. 167(2): 551-555 (1986))揭示藉由使用自*麥芽糖假絲酵母菌*基因組分離之ARS位點在該菌株中構成宿主-載體系統。

Pla, J.等人，(Gene 165(1): 115-120(1995))係關於具有自主複製活性之ARS2及ARS3*白色念珠菌*DNA片段，已證實其可促進*白色念珠菌*及啤酒酵母菌之非整合基因轉型。

須予Fournier等人之美國專利第5,212,087號揭示在*解脂耶氏酵母菌(Yarrowia lipolytica)*中有效之ARS序列以及具有該等序列之質粒。

須予Hagenson等人之美國專利第5,665,600號揭示*巴斯德畢赤酵母菌*線型質粒及其含有ARS序列之DNA片段。第'600號專利使用如Cregg等人在美國專利第4,929,555號中所述之原生質球轉型系統。

須予Cregg等人之美國專利第4,837,148號揭示能將質粒作為染色體外因子保持在*畢赤氏酵母菌*之宿主菌株中的自主複製序列。第'148號專利另外係關於包含DNA序列之構成體以及藉此轉型之生物體。該專利另外提供產生本發明DNA序列及構成體之方法，以及自任何來源分離該等序列之方法。

Chao等人，(Nature Protocols, 1(2):755-768 (2006))揭示藉由電穿孔使酵母菌細胞轉型且用5微克插入DNA及1微克載體DNA獲得最大5×10^7集合庫容量之製程。

儘管上述方法及揭示內容可達成不斷提高的轉型效率，但其仍很費力且需花費大量時間及重複性勞動才可將容量在10^6-10^7範圍內的多個小集合庫累加為容量在10^8-10^9範圍內之較大組合集合庫容量。

酵母菌集合庫尚未達成噬菌體集合庫已達成之容量或效率。如由Hoogenboom於2005年(Nature Biotech., 23(9):1105-1116)所論述，典型最大噬菌體集合庫容量為10^{10}-10^{11}，而典型酵母菌集合庫容量為10^7(遠遠小於彼等

藉由其他展示技術(Hoogenboom, H. R. (2002) *Methods Mol. Biol.* 178:1-37；Hoogenboom, H. R. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1105-16)所達成者)，但先前已報導在10^9範圍內之集合庫容量(Hoet, R. M.等人，(2005) *Nat. Biotechnol.* 23:344-8；Lipovsek, D.等人，(2007) *J. Mol. Biol.* 368:1024-41；Segal, L.等人，(2007) *Bioinformatics* 23:i440-9)。Feldhaus等人，(Nature Biotech., 21:163-170 (2003))已顯示可藉由費力地重複轉型且隨後組合經轉型集合庫來構成1.5×10^9集合庫。儘管電穿孔製程中之最新進展(參見Chao, Nature Protocols 1(2):755-768 (2006))已可在單次轉型中達成最大5×10^7之酵母菌集合庫容量，但吾人已發現Chao的製程通常以顯著較低的轉型效率轉型酵母菌。只能說，迄今為止所達成之酵母菌集合庫容量仍遠遠低於容量為10^{10}-10^{11}之噬菌體展示集合庫以常規方式可達成者。

使用磁珠與螢光活化細胞分選二者實施之酵母菌展示集合庫選擇提供了使特異性結合物富集於靶抗原上之有效且靈敏之方法，此主要係由於該選擇與螢光活化細胞分選(FACS)具有相容性。然而，由於酵母菌細胞之轉型效率較低，該選擇能力之優點受限於典型酵母菌展示集合庫之有限容量。若可使酵母菌展示選擇技術與大抗體集合庫(與彼等為噬菌體展示而製備者(容量約10^{10})類似)組合，則酵母菌展示技術將提供極為有效的抗體發現工具。

因此，業內需要使用酵母菌來產生蛋白質集合庫(例

如，抗體集合庫)之有效方法。

【發明內容】

本發明提供轉型酵母菌細胞(例如)以產生容量高達2×10^{10}之酵母菌細胞集合庫的高效快速方法。本發明方法使得可達成噬菌體集合庫規模之產率。本發明方法在使用酵母菌展示技術作為實用工具來獲得先前未研發出的大得多的抗體多樣性空間中消除了重大瓶頸，且集合庫容量目前僅受限於實驗室中可生長之酵母菌培養規模。

測試或滴定包含使用$CaCl_2$、$MgCl_2$、蔗糖、山梨醇、乙酸鋰、二硫蘇糖醇、電穿孔電壓、DNA輸入量、及細胞體積在內之多種組份及條件以確定最佳組合。藉由使用此新近研究的製程，基本上可在1天內以$1\text{-}1.5\times10^{8}$個轉型體/微克載體DNA之典型轉型效率自人類脾臟RNA構成2×10^{10}抗體集合庫。序列分析證實了抗體種系序列在此未免疫人類脾臟抗體集合庫內之多種表現形式。藉由實施實驗性集合庫選擇，吾人已確定人類抗體與TNF-α及IL-18具有低毫微莫耳親和性，此表明該集合庫之產生性。

在一個態樣中，本發明提供藉由酵母菌細胞之電穿孔製備酵母菌集合庫之方法，該方法包括以下步驟：(a)提供包括核酸載體、酵母菌細胞、山梨醇及$CaCl_2$之懸浮液；及(b)在0.5 kV/公分至大於12.5 kV/公分下及在約10-約50 μF之電容下對懸浮液實施電穿孔。在一個實施例中，本發明提供用DNA轉型酵母菌以製備集合庫之方法，該方法包括以下步驟：(a)將酵母菌細胞培養至約1.0至約2之OD_{600}；

(b)在一定體積冷水中洗滌酵母菌細胞；(c)在一定體積冷1 M山梨醇/1 mM $CaCl_2$中洗滌酵母菌細胞；(d)在一定體積30℃ 0.1M LiAc/10 mM DTT中培育酵母菌細胞；(e)在第二體積冷1 M山梨醇/1 mM $CaCl_2$中洗滌酵母菌細胞；(f)將酵母菌細胞再懸浮於第三體積冷1 M山梨醇/1 mM $CaCl_2$中以形成酵母菌細胞電穿孔懸浮液；(g)將一定體積的電穿孔細胞懸浮液添加至載體DNA及插入DNA中以形成酵母菌細胞-DNA電穿孔懸浮液；及(h)在介於約2.5 kV/公分與約12.5 kV/公分之間之電壓下於縫隙0.2公分之比色管中對酵母菌細胞-DNA電穿孔懸浮液實施電穿孔。

載體DNA與插入DNA之比率係在約1:0.5至約1:10範圍內，例如1:0.5、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10。在一個實施例中，在反應中使用約1微克載體DNA及約1微克插入DNA。在另一實施例中，使約1微克載體DNA及約2微克插入DNA沉澱。在另一實施例中，使約1微克載體DNA及約3微克插入DNA沉澱。在又一實施例中，使約1微克載體DNA及約4微克插入DNA沉澱。在再一實施例中，使約1微克載體DNA及約5微克插入DNA沉澱。

在一個實施例中，細胞懸浮液包括約50-約400微升的酵母菌細胞，例如約50、100、150、200、250、300、350、400微升的酵母菌細胞。

在一個實施例中，酵母菌細胞懸浮液為約1-約10×10^9個酵母菌細胞/毫升，例如，約1、約2、約3、約4、約5、約

6、約7、約8、約9或約10×10^9個酵母菌細胞/毫升。

在一個實施例中，用來對酵母菌細胞實施電穿孔之場強度為約0.5 kV/公分至約12.5 kV/公分，例如，約0.5、約1.0、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約4.5、約5.0、約5.5、約6.0、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5、約9.0、約9.5、約10.0、約10.5、約11.0、約11.5、約12.0、約12.5、約13.0、約13.5、約14.0、約14.5或約15.0 kV/公分。

在一個實施例中，在約10-約50(例如，約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45或約50)μF之電容下對酵母菌細胞實施電穿孔。

在一個實施例中，將酵母菌細胞懸浮於約0.1-約10 M山梨醇及約0.1-約10 mM $CaCl_2$或$MgCl_2$中，例如，約0.1、約0.25、約0.5、約0.75、約1.0、約2.0、約3.0、約4.0、約5.0、約6.0、約7.0、約8.0、約9.0或約10.0 M山梨醇，或者(例如)約0.1、約0.25、約0.5、約0.75、約1.0、約2.0、約3.0、約4.0、約5.0、約6.0、約7.0、約8.0、約9.0或約10.0 mM $CaCl_2$或$MgCl_2$。

在一個實施例中，在約0.01-約1.0 M LiAc(例如，約0.01、約0.02、約0.03、約0.04、約0.05、約0.06、約0.07、約0.08、約0.09、約0.1、約0.2、約0.3、約0.4、約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9或約1.0 M LiAc)及/或約1-約100 mM DTT(例如，約1、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90或約100 mM DTT)中培育

酵母菌細胞。

在具體實施例中，本發明提供用DNA轉型酵母菌以製備集合庫之方法，該方法包括以下步驟中的兩個或更多個：(a)將酵母菌細胞培養過夜至約1.0至約2.0之OD_{600}；(b)在水中洗滌酵母菌細胞；(c)在包括山梨醇及$CaCl_2$之溶液中洗滌酵母菌細胞；(d)在包括LiAc及DTT之溶液中培育酵母菌細胞；(e)在包括山梨醇及$CaCl_2$之溶液中洗滌酵母菌細胞；(f)將酵母菌細胞再懸浮於一定體積的包括山梨醇及$CaCl_2$之溶液中以形成酵母菌細胞電穿孔懸浮液；(g)將一定體積的電穿孔細胞懸浮液添加至載體DNA及插入DNA中以形成酵母菌細胞-DNA電穿孔懸浮液；及(h)在介於約2.5 kV/公分與約12.5 kV/公分之間之電壓下於縫隙0.2公分之比色管中對酵母菌細胞-DNA電穿孔懸浮液實施電穿孔。

在另一具體實施例中，本發明提供用DNA轉型酵母菌之方法，該方法包括以下步驟中的兩個或更多個：(a)藉由將DNA沉澱成沉澱物隨後再懸浮於最小體積中而使以約1:0.5至約1:10之比率存在之載體DNA與插入DNA的體積最小化；(b)藉由以下步驟將酵母菌細胞自菌落培養至適當生長狀態：(i)用得自生長面或部分酵母菌生長培養物之酵母菌菌落在第一體積的培養基上接種；(ii)使酵母菌細胞在30℃下生長過夜；(iii)用得自步驟(ii)之細胞在第二體積的培養基上接種且使該等細胞在30℃下生長直至其達到約1.3至約1.6之OD_{600}為止；(c)藉由離心沉澱酵母菌細胞；(d)用冷水洗滌酵母菌細胞；(e)用冷1 M山梨醇/1 mM

$CaCl_2$洗滌酵母菌細胞；(f)將酵母菌細胞再懸浮於0.1 M LiAc/10 mM DTT中；(g)在30℃及250 rpm下培育酵母菌細胞30分鐘；(h)用1 M山梨醇/1 mM $CaCl_2$洗滌酵母菌細胞；(i)將酵母菌細胞再懸浮於1 M山梨醇/1 mM $CaCl_2$中以形成酵母菌細胞電穿孔懸浮液；(j)將一部分酵母菌細胞電穿孔懸浮液添加至DNA沉澱物中以形成酵母菌細胞-DNA電穿孔懸浮液；(k)在約0.5 kV至約2.5 kV範圍內及25 μF電容下對酵母菌細胞-DNA電穿孔懸浮液實施電穿孔；(l)將1 M山梨醇/YPD之1:1混合物(最終濃度：0.5 M山梨醇、0.5x YPD)添加至經電穿孔酵母菌細胞-DNA電穿孔懸浮液中並在30℃下培育1小時；及(m)沉澱酵母菌細胞並使其再懸浮於10毫升1 M山梨醇中。

【實施方式】

啤酒酵母菌之高效電穿孔製程係藉由測試並組合數種先前已確認之條件來建立(Chao, G.等人，(2006) *Nat. Protoc.* 1:755-68；Becker, D. M.及Guarente, L. (1991) *Methods Enzymol.* 194:182-7；Helmuth, M.等人，(2001) *Anal. Biochem.* 293:149-52；Neumann, E.等人，(1996) *Biophys. J.* 71:868-77；Simon, J. R. (1993) *Methods Enzymol.* 217:478-83；Suga, M.及Hatakeyama, T. (2003) *Curr. Genet.* 43:206-11；Thompson, J. R.等人，(1998) *Yeast* 14:565-71)。該等條件包含組合乙酸鋰(LiAc)與二硫蘇糖醇(DTT)作為細胞調節劑，該兩者係用來提高酵母菌轉型之頻率(Helmuth, M.等人，(2001) *Anal. Biochem.* 293:149-

52；Thompson, J. R.等人，(1998) *Yeast* 14:565-71；Gietz, R. D.等人，(1995) *Yeast* 11:355-60)；且該等條件包含在電穿孔緩衝液中納入山梨醇及氯化鈣(Becker, D. M.及Guarente, L. (1991) *Methods Enzymol.* 194:182-7；Helmuth, M.等人，(2001) *Anal. Biochem.* 293:149-52；Neumann, E.等人，(1996) *Biophys. J.* 71:868-77)。

定義：

術語「表現載體」意指含有自主複製位點(ARS)、轉錄起始位點及至少一個編碼欲在宿主生物體中表現之蛋白質之結構基因的DNA構成體。複製位點或複製起點係控制選殖及表現載體之複製的任一DNA序列。表現載體通常亦含有適當的調控區，例如，控制蛋白質在宿主酵母菌中表現之一或多個增強子及/或啟動子、抑制子及/或沉默子，及終止子。本發明表現載體亦可含有選擇標記，其包括如本文所述之必須基因。表現載體亦可視情況含有易於在市場上購得且為彼等熟習此項技術者所熟知之其他可選擇標記。表現載體係載體中的一類。載體可視情況包含一或多個得自一或多種酵母菌菌株之ARS序列(因子)。

術語「有效連接」意指DNA區段之排列方式使得其能按預期目的發揮作用，舉例而言，在啟動子內開始轉錄並經過編碼區段進行到終止子。

術語「轉型」意指將DNA或其他核酸引入受者酵母菌宿主細胞中，此改變基因型。

術語「轉型體」或「經轉型細胞」意指已經受轉型之受

者酵母菌宿主細胞或其子代。

可用於本發明電穿孔法中之載體通常包含可藉由酵母菌細胞增殖之pYD載體及任何其他載體及其衍生構成體或核酸。本發明表現載體可基於任一類型的載體，只要該載體可轉型、轉染或轉導宿主酵母菌細胞即可。在較佳實施例中，表現載體係基於酵母菌質粒，尤其得自啤酒酵母菌者。在酵母菌細胞轉型後，用細胞吸收編碼集合庫序列之外源DNA且隨後由經轉型細胞來表現。

更佳地，表現載體可係可在*大腸桿菌*或酵母菌中增殖之酵母菌-細菌穿梭載體(Struhl等人，(1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76:1035-1039)。納入*大腸桿菌*質粒DNA序列(例如pBR322)有助於大腸桿菌中載體DNA之定量製備且從而有助於酵母菌之有效轉型。

可用作穿梭載體之酵母菌質粒載體的類型可係複製型載體或整合型載體。複製型載體係由於存在DNA複製之功能性起點，不需依賴酵母菌染色體DNA即可介導其自行維持之酵母菌載體。整合型載體需依賴與染色體DNA重組才有助於複製且從而在宿主細胞中持續維持重組DNA。複製型載體可為以2微米質粒為主之質粒載體，其中DNA複製起點係得自內源2微米酵母菌質粒。或者，複製型載體可係自主複製(ARS)載體，其中「表觀」複製起點係得自酵母菌之染色體DNA。視情況，複製型載體可為著絲點(CEN)質粒，其中除了上述一個DNA複製起點外，亦具有已知包含著絲點之酵母菌染色體DNA之序列。

可呈閉環形式或呈線性形式將載體轉型至酵母菌細胞中。儘管藉由整合型載體轉型酵母菌具有可遺傳的穩定性，但當載體呈閉環形式時可能效率不高(例如，產率僅為約1-10個轉型體/微克DNA)。含有游離端(其位於與酵母菌染色體DNA同源之DNA序列中)之線性化載體可依較高效率(100-1000倍)轉型酵母菌，且通常發現轉型DNA整合至與裂解位點同源之序列中。因而，藉由用適宜之限制性核酸內切酶裂解載體DNA可提高轉型效率且靶向染色體整合位點。整合轉型可能適用於釀酒酵母菌之基因修飾法，其限制條件係該轉型效率應足夠高且用來整合之靶DNA序列應在不破壞宿主細胞新陳代謝所必需基因的區域內。

具有高複本數(約20-50複本/細胞)之ARS質粒往往最不穩定，且每代之損失頻率超過10%。然而，ARS質粒之穩定性可藉由附接著絲點而提高；著絲點質粒係以1或2個複本/細胞存在且每代僅損失約1%。使用本發明電穿孔法藉由酵母菌宿主細胞表現之蛋白質的非限制性實例包含任何目標基因之蛋白質，包含抗體及抗體片段、激素、細胞因子及淋巴因子、受體、黏附分子及酵素。

可藉由本發明電穿孔法轉型之酵母菌株包含酵母菌屬(*Saccharomyces*)(例如啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*))及裂殖酵母屬(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces Pombe*))中的酵母菌物種。在一個實施例中，酵母菌細胞係二倍體酵母菌細胞。或者，酵母菌細胞係單倍體細胞，例如酵母菌單倍體細胞之

「a」及「α」菌株。

本發明提供酵母菌細胞之轉型方法，其包括對含有酵母菌以及一或多種核酸構成體之細胞懸浮液實施電穿孔。酵母菌細胞之轉型可產生自單一純系至酵母菌細胞群(即，酵母菌集合庫)中之任何一種，該產物可用來篩選：(a)在酵母菌細胞表面上展示之肽或蛋白質，其係藉助於拴系至酵母菌表面蛋白質或經由特異性共價鍵或非共價相互作用與酵母菌細胞表面蛋白質或其他組份結合來展示；(b)細胞內表現之肽或蛋白質；或(c)分泌至細胞外間隙(例如培養基)中或沈積至固體表面上之肽或蛋白質。此等酵母菌集合庫可方便地適應多種用途，以篩選或表徵肽或蛋白質與可引入酵母菌細胞中或以外源方式添加之另一蛋白質、肽、DNA、RNA或其他化學物質之間的相互作用。特定實例係彼等見於酵母菌展示、酵母菌雙雜交、酵母菌三雜交等中者。

本發明提供酵母菌細胞之轉型方法，其包括使用一或多種足以轉型酵母菌細胞之電阻、場強度及脈衝持續時間對含有酵母菌以及一或多種核酸構成體之細胞懸浮液實施電穿孔，該等核酸構成體包括一或多個調控序列及一或多個基因或基因區段。

在一個實施例中，場強度為約2.5 kV/公分至約12.5 kV/公分。在某些實施例中，場強度為約0.5 kV/公分、約1.0 kV/公分、約1.5 kV/公分、約2.0 kV/公分或約2.5 kV/公分。該等值慮及電穿孔比色管之縫隙為0.2公分。可使用

較高場強度，但其實用性很大程度上取決於可遞送較強脈衝之裝置的發展。

在一個實施例中，脈衝持續時間為約3毫秒至約10毫秒。在特定實施例中，脈衝持續時間為約4.8毫秒。

藉由本發明電穿孔法處理細胞係藉由將電場施加至電極對之間之酵母菌細胞懸浮液來實施。場強度須進行相當精確地調節，以使細胞之電穿孔不對細胞造成損傷、或損傷程度最小。隨後可量測電極之間的距離且隨後可將根據式E=V/d所得之適宜電壓施加至電極(E=電場強度，以伏/公分表示；V=電壓，以伏表示；且d=距離，以公分表示)。

實施本文所述程序之脈衝發生儀可在市場上購得且已銷售多年。一種適宜信號發生儀係Gene Pulser II(Bio-Rad Laboratories公司，Hercules, CA)。典型裝備由連接至電容擴充器插件之Gene Pulser II及脈衝控制儀插件模組組成。

其他市售電穿孔型號包含Gene Pulser MXcell系統或Gene Pulser×cell真核系統(Bio-Rad)、CelljecT Pro Electroporator (Thermo Scientific)、多功能電穿孔儀(Multiporator Electroporation Systems)及其他Eppendorf® Electroporation Systems (Eppendorf, North America)、ECM電穿孔發生儀及BTX® HT 96 Well Electroporation System (BTX, Harvard裝置)，其全部皆係使用本文所揭示之條件對酵母菌細胞實施電穿孔之適宜裝置。

本發明中使用電穿孔以促進將DNA引入酵母菌細胞中。電穿孔係使用脈衝電場使細胞膜瞬間通透化以使大分子

(例如DNA)可穿入細胞之方法。然而，將DNA轉移至細胞中之實際機理尚未完全瞭解。舉例而言，對於*著明假絲酵母*之轉型，當細胞暴露於場強度為約10-約13 kV/公分且電阻值為約R5(129歐姆)且時間常數為約45毫秒之實驗衰變脈衝電場中時，電穿孔驚人地有效。通常，電阻及電容可存在或可由用戶加以選擇，視所選擇電穿孔設備而定。在任何情況下，根據製造商的說明書配置設備以視需要提供場強度及衰變參數。

本發明另外係關於酵母菌之高效轉型方法，其容許大量表現任何一或多種期望內源(即，天然存在於該酵母菌細胞內)或異源基因。本發明方法另外係關於製備(例如)表現抗體或嵌合體或其片段之集合庫的方法。

在一種製程中，具有目標基因之表現載體可藉由電穿孔轉型至酵母菌宿主細胞中以產生單一純系或集合庫而，該集合庫包括表現細胞內蛋白質(例如，核蛋白或細胞質蛋白)、膜蛋白(例如，跨膜蛋白或膜黏附蛋白)或分泌蛋白之多種轉型細胞。吾人將能使用經轉型細胞或集合庫來純化蛋白質，研究蛋白質功能，確定蛋白質-蛋白質相互作用，或確定新穎蛋白質結合物或相互作用夥伴。應著重注意產生展示或表現抗體及抗體片段之極大酵母菌集合庫的能力。該集合庫可經靶抗原選擇以確定結合至選擇抗原之抗體。

由於經轉型酵母菌易於損失人工構成之質粒，因此有利的是使用可對其施加正選擇壓力之培養基。當菌株係必須

代謝產物之營養缺陷型突變體且所使用載體質粒包括能恢復菌株原營養之標記基因(例如，上文所提及之LEU2基因)時，該選擇壓力可藉由自培養基去除該代謝產物來施加。亦存在獲得相同結果之其他方式且其亦可用來實施本發明。

視目標結構基因之性質而定，產物或表現產物可保留在酵母菌宿主細胞之細胞質內或被分泌出來。已發現，保留在細胞內之蛋白質以及所分泌之彼等皆可溶解。當欲使產物或表現產物保留在酵母菌宿主細胞內時，通常可期望其具有可誘導轉錄啟動區域，以使在轉型體達到高密度之前極少或不表現或產生期望產物。在產物或表現產物經充足時間表現後，可藉由習用方法(例如離心、裂解)將細胞分離並分離目標產物。視產物性質及用途而定，裂解產物可經受多種純化方法，例如層析、電泳、溶劑萃取、結晶、透析、超濾或諸如此類。層析方法包含(但不限於)氣相層析、HPLC、管柱層析、離子交換層析及為彼等熟習此項技術者所習知之其他層析方法。純度可介於約50%至90%或更高之間、較佳高達約100%。

或者，目標表現產物或產物可分泌至培養基中，且係連續產生，其中去除部分培養基，(例如)藉由管柱層析或親和層析、超濾、沉澱或諸如此類提取期望產物，且將使用過的培養基丟棄或藉由補充必須組份再循環。可藉由蒸發進一步濃縮得自超濾之含有產物的透過液，隨後使用醇及/或pH調節來結晶或沉澱。彼等熟習此項技術者應知道多種

方法選擇。當欲分泌產物時，通常將使用組成型轉錄啟動區域，但亦可使用非組成型區域。

除非另有說明，否則本文最近所述之所有核苷酸序列皆係使用自動DNA序列分析儀(例如，舉例而言，得自PE Applied Biosystems公司之377型)來測定。因此，如業內所習知，對於藉由該自動方法所測定之任何DNA序列，本文所測定之任一核苷酸序列皆可能含有某些錯誤。自動測定之核苷酸序列與所測序DNA分子之實際核苷酸序列的一致性通常為至少約90%、更通常為至少約95%至至少約99.9%。實際序列可藉由包含業內所熟知之手動DNA測序方法在內之其他方法更精確地測定。

例證

實例1：載體DNA之製備

用限制性酵素SfiI及NotI消化pYDsTev載體以用於與scFv+300 bp DNA片段重組。為改良效率且防止未切割載體轉型，用BglII及HpaI(二者皆在填充片段內切割)進一步消化經SfiI/NotI消化之載體。

使用得自Bioline (Randolph, MA)之Sureclean純化經消化DNA。簡言之，將限制性消化物與等體積Sureclean混合。將試樣在室溫下培育10分鐘。隨後將試樣在13.2 k rpm下離心15分鐘。丟棄上清液並用2.5x試樣體積的70%乙醇洗滌沉澱物。隨後將試樣在13.2 k rpm下離心15分鐘。去除上清液並將沉澱物風乾。將沉澱物再懸浮於5-10微升TE pH 8中。

實例2：插入DNA之製備

插入DNA係使用PCR來製備以擴增目標插入DNA，其中將充足載體序列5'及3'(例如，約300個鹼基對)添加至插入DNA中以有效實施同源重組。

設計可與免疫球蛋白之IgM及IgG(對於IgM/G cDNA)或IgK(IgK cDNA)雜交之免疫球蛋白恆定區域引物(表2)以供第一鏈cDNA合成。具體而言，對於IgM/G cDNA引物，使用FcgRev1、2及3與FcmRev1、2及3。對於IgK第一鏈cDNA合成，使用Ckrev1、2及3。

cDNA合成反應係使用Invitrogen第一鏈合成套組藉助上述引物來實施。

表1：實例性PCR反應(步驟1)

IgM/G cDNA	IgK cDNA
20微升50奈克/微升CloneTech聚A脾臟RNA	10微升50奈克/微升CloneTech聚A脾臟RNA
3微升300奈克/微升FcgRev1	1.5微升300奈克/微升CkRev1
3微升300奈克/微升FcgRev2	1.5微升300奈克/微升CkRev2
3微升300奈克/微升FcgRev3	1.5微升300奈克/微升CkRev3
3微升300奈克/微升FcmRev1	10微升dNTP (10 mM)
3微升300奈克/微升FcmRev2	**75.5微升二次蒸餾水**
3微升300奈克/微升FcmRev3	100微升總體積
20微升dNTP (10 mM)	
142微升二次蒸餾水	
200微升總體積	

50微升/rxn，在65℃下反應5分鐘，隨後冷卻至4℃並保持1分鐘

表2：在該研究中使用之寡核苷酸

寡核苷酸名稱	序列	說明	SEQ ID NO
Ckrev1	TCCACCTTCCACTG	Ck反向引物1	SEQ ID NO:1
Ckrev2	CAGGCACACAACAG	Ck反向引物2	SEQ ID NO:2
Ckrev3	GAGTGTCACAGAGC	Ck反向引物3	SEQ ID NO:3
FcGrev1	AGTTCCACGACACC	IgG反向引物	SEQ ID NO:4
FcGrev2	GAAGGTGTGCACG	IgG反向引物	SEQ ID NO:5
FcGrev	CCACGCTGCTGAG	IgG反向引物	SEQ ID NO:6
FcMrev1	ACTTTGCACACCAC	IgM反向引物	SEQ ID NO:7
FcMrev2	TTTGTTGCCGTTGG	IgM反向引物	SEQ ID NO:8
FcMrev3	GGGAATTCTCACAGG	IgM反向引物	SEQ ID NO:9
PYD5prev	GCGCCCTGAAAATA CAGGTTTTC	在pYD載體中緊鄰SfiI位點上游雜交。與5107引物一起使用來產生約300 bp添加至scFv之延伸以提高同源重組效率	SEQ ID NO:10

合成之步驟2：

將45微升Master Mix(所製備包括80微升RT緩衝液(10x)、160微升$MgCl_2$、80微升0.1 M DTT、40微升RNAse Out之原液)添加至各經冷凍的50微升反應物中且將管置於42℃下2分鐘。將5微升SuperscriptII逆轉錄酶添加至各反應管中且在42℃下培育50分鐘，轉移至70℃保持15分鐘，且隨後轉移至4℃下。將5微升RNAse H添加至各反應物中且隨後在37℃下培育20分鐘。收集四次IgG/M反應物且收集兩次IgK反應物。

實例3：人類脾臟IgG/M VH及IgK VL DNA之產生

人類VH及VK免疫球蛋白多樣性係使用由Sblattero及Bradbury (1998) *Immunotechnology* 3:271-278所定義之寡核苷酸引物擴增。

8x 100微升試樣VH反應

80微升	10x PCR反應緩衝液
8微升	dNTP (10 mM)
32微升	$MgSO_4$ (50 mM)
8微升	VH反向引物(20 μM)
8微升	VH 1/2、VH4/5、VH3及VH6之等莫耳混合物(各5 μM/總共20 μM 3'引物)
16微升	IgM/G cDNA
8微升	Platinum Taq HiFi

640微升二次蒸餾水

100微升/rxn

8x 100微升試樣VK反應

80微升	10x PCR反應緩衝液
8微升	dNTP (10 mM)
32微升	$MgSO_4$ (50 mM)
8微升	VK反向引物(20 μM)
8微升	VK1、VK2/4、VK3及VK5之等莫耳混合物(各5 μM/總共20 μM 3'引物)
16微升	IgK cDNA
8微升	Platinum Taq Hi Fi

640微升二次蒸餾水

100微升/rxn

PCR程序-

1. 94℃ 2分鐘
2. 94℃ 30秒
3. 55℃ 30秒
4. 68℃ 30秒
5. 將步驟2重複實施39次
6. 68℃ 5分鐘
7. 保持在4℃下

在1% GTG瓊脂糖凝膠上純化反應物。使用Qiaquick Gel Extraction套組純化適當大小(約400 bp)之帶。每個離心管柱皆使用含0.4毫克DNA之瓊脂糖。用50微升預熱至55℃之EB洗脫試樣。收集相同試樣並使用Nanodrop分光光度計(Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware)測定$A_{260/280}$。

實例4：VH/VK scFv之產生

VH/VK scFv係藉由重疊延伸剪切技術(Splicing by Overlapping Extension)(SOE) PCR來產生。VH正向及VK反向引物具有同源性，其產生連接VH與VL區域以產生scFv分子的$(Gly_4Ser)_3$連接體。反應設置如下：

24 rxn，100微升/rxn(VH10/VK組合作為實例)

240微升	10x Plat Taq Hi Fi緩衝液
24微升	dNTP (10 mM)
96微升	$MgSO_4$ (50 mM)

24微升	scFv Rev (20 μM)
24微升	scFv正向引物(20 μM)
141微升	VH10反向引物(24皮莫耳VH/1皮莫耳/100微升rxn)
72微升	VK1、2、9及12 DNA之等莫耳混合物(共24皮莫耳/各VK 0.25皮莫耳/100微升rxn)
24微升	Platinum Taq HiFi
1755微升	**二次蒸餾水**
100微升/rxn	

PCR程序-

1. 94℃ 2分鐘
2. 94℃ 30秒
3. 55℃ 30秒
4. 68℃ 1分鐘
5. 將步驟2重複實施39次
6. 68℃ 5分鐘
7. 保持在4℃下

如上文針對VH或VK凝膠片段所述對scFv帶(約800 bp)實施凝膠純化。收集相同試樣以與pYD5' 300 bp片段一起用於SOE PCR中。

為確保提高轉型效率，吾人將插入DNA片段設計為與pYD載體中之scFv插入位點(SfiI)具有約300 bp的同源5'。為將此同源性添加至人類脾臟scFv中，設計與緊鄰pYD1sTev SfiI位點上游之區域互補之引物(pYD5prev)。該

引物與pYD1 5'引物(5107)組合使用以產生約300 bp片段，且欲藉由SOE PCR將該片段添加至現有脾臟scFv中。

5107/pYD5prev PCR

1微升	pYDsTev (10奈克/微升)
10微升	10x Plat Taq Hi Fi緩衝液
4微升	$MgSO_4$ (50 mM)
1微升	dNTP (10 mM)
1微升	5107 (20 μM)
1微升	pYD5prev (20 μM)
1微升	Platinum Taq Hi Fi
80微升	**二次蒸餾水**

100微升/rxn

PCR程序

1. 94℃ 2分鐘
2. 94℃ 30秒
3. 55℃ 30秒
4. 68℃ 30秒
5. 將步驟2重複實施39次
6. 68℃ 5分鐘
7. 保持在4℃下

如上文針對VH或VK凝膠片段所述對5107/pYD5prev帶(約300 bp)實施凝膠純化。收集相同試樣以與脾臟scFvs一起用於SOE PCR中。

scFv+300 PCR(16x100微升rxn混合物)

162微升	10x Plat Taq Hi Fi緩衝液
16.2微升	dNTP (10 mM)
64.8微升	$MgSO_4$ (50 mM)
16.2微升	5107 (20 μM)
16.2微升	scFv正向引物(20 μM)
32.4微升	VH/VK scFv DNA
16.2微升	5107/pYDprev5 DNA
16.2微升	Platinum Taq HiFi
1279.8微升	**二次蒸餾水**

100微升/rxn

如上文針對scFv反應所述來實施PCR反應。如上文針對VH或VK凝膠片段所述對ScFv+300 bp(約1100 bp)實施凝膠純化。收集相同試樣以用於電穿孔反應中。

實例5：先前技術中之酵母菌集合庫轉型製程

以下係先前技術中之酵母菌轉型製程。用EBY100菌落對5毫升YPD培養基實施接種(用新鮮菌落在YPD板上劃線)並在30℃下生長過夜。使用過夜培養物將50毫升培養物在YPD培養基中接種至600奈米吸光率為0.1，且經約6小時使細胞在30℃下生長至600奈米吸光率為約1.3至1.5。細胞須處於對數生長早中期。使用對數晚期或穩定期之細胞會大幅降低轉型效率。當細胞生長時，根據製造商製程使用PelletPaint使DNA沉澱以供轉型。通常，使用欲放入4個電穿孔比色管(各含有5毫克插入載體及1毫克切割載體)中之DNA來產生約5×10^7之集合庫。亦製備僅具有主鏈之對

照。使DNA保留沉澱物形式。插入載體:主鏈比率可在5:1至1:1間變化且每個比色管含有至少1毫克主鏈。

一旦細胞在600奈米處之吸光率達到約1.3-1.5，則將500微升Tris-DTT緩衝液添加至培養物中並在振盪器中於30℃下培育15分鐘。轉型效率在10-20分鐘之DTT培育時間內相對恆定，但在培育超過20分鐘後顯著下降。在4℃下以2,500 g使細胞沉澱3分鐘，並用25毫升冰冷E緩衝液(10 mM Tris pH 7.5、270 mM蔗糖、1 mM $MgCl_2$)進行洗滌(例如，沖洗、再沉澱且抽吸上清液)。將細胞再次用1毫升冰冷E緩衝液洗滌並再懸浮於E緩衝液中至300微升之總體積。將DNA對照沉澱物再懸浮於適當體積的細胞懸浮液(50微升/比色管)中。將細胞保持在冰上。向各預冷凍電穿孔比色管中加入50微升再懸浮細胞-DNA混合物等份試樣並將電穿孔比色管保持在冰上直至實施脈衝為止。

將比色管裝入基因脈衝儀中並在0.54 kV及25 μF下實施電穿孔且不使用脈衝控制儀。將1毫升溫熱(30℃)YPD培養基立即添加至比色管中。電穿孔之典型時間常數在約15毫秒至40毫秒間變化且不顯著影響轉型效率。

將細胞自經脈衝比色管轉移至15毫升Falcon管中。每個比色管皆用另外1毫升YPD培養基洗滌以自比色管回收剩餘細胞。將細胞在30℃下振盪1小時。在2,500 g下使細胞沉澱5分鐘且去除上清液並將其再懸浮於10毫升SDCAA培養基中。將連續稀釋液塗敷於SDCAA板上以測定轉型效率。僅具有主鏈之對照應具有比主鏈-加-插入載體轉型者

低1%的效率。將細胞懸浮液轉移至含有100-1000毫升SDCAA培養基加青黴素-鏈黴素(1:100稀釋液)之燒瓶中並在30℃下培育24-48小時。該方法係用來產生8×10^7集合庫且對應於表3中所述處理7，且與本發明最佳製程(參見實例6)相比，其效率為0.4%。

實例6：本發明方法2之酵母菌集合庫轉型製程

本發明提供轉型酵母菌細胞(例如)以供產生容量高達2×10^{10}之酵母菌細胞集合庫的高效快速方法。測試並滴定包括使用$CaCl_2$、$MgCl_2$、蔗糖、山梨醇、乙酸鋰、二硫蘇糖醇(DTT)、電穿孔電壓、DNA輸入量及細胞體積在內之多種組份及條件以確定最佳條件。

本發明電穿孔製程係根據以下製程的變化形式：Suga及Hatakeyama (2003) Curr. Genet. 43:206-211；Neumann等人，(1996) Biophys. J. (1996) 71:868-877；Thompson等人，(1998) Yeast 14:565-571；Becker及Guarente (1991) Methods Enzymol. 194, 182-187；Melihon等人，(1990) Biotechnology 8:223-227；Helmuth等人，(2001) Analytical Biochem. 293:149-152；及實例5中所提供製程。

酵母菌細胞之製備：使啤酒酵母菌過夜生長至穩定期。將等份培養物接種至100毫升YPD培養基中以達到OD_{600}約0.3。使細胞生長至OD_{600}達到約1.6，然後藉由離心收集。用冷水洗滌細胞沉澱物2次，用50毫升電穿孔緩衝液(1 M山梨醇/1 mM $CaCl_2$)洗滌1次，並在20毫升0.1 M LiAc/10

mM DTT中於30℃下培育30分鐘。再次用50毫升電穿孔緩衝液洗滌細胞，隨後懸浮於100-200微升電穿孔緩衝液中至體積達到1毫升。此相當於約1-10×10^9個細胞/毫升。

電穿孔：電穿孔法之每個比色管皆使用100、200、300、或400微升細胞懸浮液，並使用1、2、3、或4微克線性化載體及相應的3、6、9、或12微克插入DNA(載體與插入DNA比率=1:3)。在2.5 kV及25 μF下於BioRad GenePulser比色管(0.2公分電極縫隙)中對細胞實施電穿孔。典型電穿孔時間常數介於3.0-4.5毫秒之間。於電穿孔後，將細胞懸浮於10毫升1 M山梨醇：YPD培養基之1:1混合物中並在30℃下培育1小時。隨後收集細胞並在含有20克/升葡萄糖、6.7克/升無胺基酸之以酵母菌為主之氮、5.4克/升Na_2HPO_4、8.6克/升$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$及5克/升水解酪蛋白胺基酸之SD-UT(-ura、-trp)培養基中培養。轉型體之數量係藉由將經轉型細胞之10倍連續稀釋液塗敷於選擇性SD-UT板上來測定。參考圖3，72小時後計算菌落數且以轉型體數量平均值/微克載體DNA±標準偏差表示轉型效率(A)；且以每支比色管之轉型體總數平均值±標準偏差表示產率(B)。

LiAc、DTT、$CaCl_2$及山梨醇之組合使1微克載體DNA及100微升酵母菌細胞，依1.6×10^9個細胞/毫升之密度(由600奈米下之光學密度來測定，假定1 OD相當於10^7個細胞)一致產生3±1×10^7個轉型體/微克載體DNA之轉型效率(圖3)。此表示約2%的酵母菌細胞成功轉型且預計可自1個電穿孔

比色管達成$3\pm1\times10^7$之集合庫容量。為製備甚至更大的集合庫，評估每個單獨比色管之最佳細胞體積。令人驚奇地，當每個比色管中細胞體積由100微升升高至200微升時，轉型效率顯著升高至1×10^8個轉型體/微克載體DNA。在縫隙0.2公分之比色管中之400微升最大細胞體積下，可使用相同密度及細胞與DNA之比率，由1個比色管很容易即可產生超過5×10^8之集合庫容量(圖3)。

該電穿孔法具有高度可重現性，此乃因不同操作者在2個不同電穿孔儀(BioRad Gene Pulser™第1652076型號及Gene Pulser® II第1652108型號)上皆可得到相似的轉型效率。

實例7：比較LiAc、DTT、山梨醇及$CaCl_2$之使用對啤酒酵母菌之電穿孔效率的增強

表3展示實例7方法以及該方法之變化形式的電穿孔效率、每個比色管之產率、效率%及最大集合庫容量。

表3

處理	電穿孔效率[a]$\times10^7$	每個比色管之產率[b]$\times10^7$	效率%[c]	最大集合庫容量[d]
1.組合製程	18.3±2.5	73.2±9.7	100	2×10^{10}
2.不含LiAc	1.7±0.1	6.7±0.4	9	1.4×10^9
3.不含DTT	0.81±0.017	3.3±0.07	4	8×10^8
4.山梨醇/$MgCl_2$	11.4±0.9	45.5±3.5	62	9×10^9
5.僅含山梨醇	9±1.8	36±7.1	49	8×10^9
6.蔗糖/$CaCl_2$	0.4±0.3	1.6±1.5	2	3.8×10^8
7.蔗糖/$MgCl_2$	0.09±0.01	0.4±0.07	0.4	8×10^7

[a]轉型體數/微克載體DNA

[b]轉型體總數/比色管電穿孔反應

[c]假定使用該製程所獲得之轉型效率等於100%

[d]假定1天內實施25次比色管電穿孔反應

組合製程係實例7中所述者，其對400微升具有4微克載體及12微克插入DNA之酵母菌懸浮液(1.6×10^9/毫升)實施電穿孔。對於其他處理，遵循實例7之組合製程，只是存在以下變化：(2)僅用DTT對細胞實施預處理；(3)僅用LiAc對細胞實施預處理；(4)使用$MgCl_2$替代$CaCl_2$；(5)電穿孔緩衝液不包含$CaCl_2$；(6)使用270 mM蔗糖替代1 M山梨醇；及(7)使用270 mM蔗糖/1 mM $MgCl_2$作為電穿孔緩衝液。

如表3中所示，取消DTT或LiAc預處理分別導致效率降低93.3%及85.7%。類似地，取消山梨醇或由蔗糖替代其導致效率損失96%以上(表3及數據未示出)。此與先前發現一致：電穿孔後山梨醇穩定滲透壓及支撐酵母菌膜完整性之能力係達成高轉型效率之至少部分原因(Becker, D. M.及Guarente, L. (1991) *Methods Enzymol.* 194:182-7；Weaver, J. C.等人，(1988) *FEBS Lett.* 229:30-4)。在電穿孔期間$CaCl_2$的存在(大概其有助於DNA結合至細胞膜上)(Neumann, E.等人，(1996) *Biophys. J.* 71:868-77)似乎係重要性最低之因素，此乃因取消其僅將轉型效率稍稍降低30%且由$MgCl_2$替代其僅導致小幅降低11%。

實例8：電壓對電穿孔效率之影響

實施實驗來測定電壓對電穿孔效率之影響且測定最佳載體:插入比率。將該實驗實施兩次。使用在0.5-2.5 kV範圍內之數種電壓及在1:1至1:10 (w/w)範圍內之數種載體:插入比率來實施實例2之製程，其中載體DNA之量恆定保持在1微克。如上所述，使用SureClean濃縮且沉澱所有反應物並將DNA沉澱物再懸浮於二次蒸餾水中，然後添加細胞懸浮液。

在每一實驗中，如上所述製備酵母菌細胞。在5次反應中載體/插入之體積皆固定在11.6微升。

實驗1

表4：展示菌落計數隨載體:插入比率及場強度變化的圖表[1]

	2.5 kV/公分	5 kV/公分	7.5 kV/公分	10 kV/公分	12.5 kV/公分
1:1	0	0	2	83	21
1:2	0	2	26	170	160
1:3	0	1	84	212	104
1:4	6	1	104	362	139
1:5	0	1	61	179	68
1:10	0	3	52	182	126

[1]電穿孔係在縫隙0.2公分之比色管中且在介於0.5-2.5 kV間之電壓下實施

表5：轉染效率隨載體:插入比率及場強度而變化[1]

轉染效率	7.5 kV/公分	10 kV/公分	12.5 kV/公分
1:1	2.00E+06	8.30E+07	2.10E+07
1:2	2.60E+07	1.70E+08	1.60E+08

1:3	8.40E+07	2.12E+08	1.04E+08
1:4	1.04E+08	3.62E+08	1.39E+08
1:5	6.10E+07	1.79E+08	6.80E+07
1:10	5.20E+07	1.82E+08	1.26E+08

[1]電穿孔係在縫隙0.2公分之比色管中且在介於0.5-2.5 kV間電壓下實施

結果：在1:1載體:嵌段比率且在1.5至2.5之電壓範圍下、在1:2載體:插入比率且在1.0至2.5之電壓範圍下、在1:3載體:插入比率且在1.0至2.5之電壓範圍下、在1:4載體:插入比率且在0.5至2.5之電壓範圍下、在1:5載體:插入比率且在1.0至2.5之電壓範圍下及在1:10載體:插入比率且在1.0至2.5之電壓範圍下檢測轉型。對於所有載體:插入比率，皆係使用2.0 kV之電壓來達成峰值菌落計數。最佳條件看來係載體:插入比率為1:4且電壓為2.0 kV，其中達成3.62×10^{8}之轉染效率。

實驗2

表6：展示菌落計數隨載體:插入比率及場強度變化之圖表[1]

數據組2	**2.5 kV/公分**	**5 kV/公分**	**7.5 kV/公分**	**10 kV/公分**	**12.5 kV/公分**
1:1	0	1	19	65	44
1:2	0	0	45	110	154
1:3	0	1	37	92	152
1:4	0	1	50	136	160
1:5	0	1	51	116	163
1:10	0	1	0	123	167

[1]電穿孔係在縫隙0.2公分之比色管中且在介於0.5-2.5 kV

間之電壓下實施

表7：轉染效率隨載體:插入比率及場強度而變化[1]

轉染效率	7.5 kV/公分	10 kV/公分	12.5 kV/公分
1:1	1.90E+07	6.50E+07	4.40E+07
1:2	4.50E+07	1.10E+08	1.54E+08
1:3	3.70E+07	9.20E+07	1.52E+08
1:4	5.00E+07	1.36E+08	1.60E+08
1:5	5.10E+07	1.16E+08	1.63E+08
1:10	0.00E+00	1.23E+08	1.67E+08

[1]電穿孔係在縫隙0.2公分之比色管中且在介於0.5-2.5 kV間之電壓下實施

結果：在1:1載體:插入比率且在1.0至2.5之電壓範圍下、在1:2載體:插入比率且在1.5至2.5之電壓範圍下、在1:3載體:插入比率且在1.0至2.5之電壓範圍下、在1:4載體:插入比率且在0.5至2.5之電壓範圍下、在1:5載體:插入比率且在1.0至2.5之電壓範圍下及在1:10載體:插入比率且在1.0至2.5之電壓範圍下檢測轉型，在1.5 kV下無菌落。對於1:1之載體:插入比率，係使用2.0 kV之電壓來達成峰值菌落計數。對於所有其他載體:插入比率，2.5 kV電壓最佳。最佳條件看來係載體:插入比率為1:10且電壓為2.5 kV。該實驗之結果表明，最佳電壓為2-2.5 kV，且在比率大於1:2後，插入之量相對於載體增加不提供顯著優點。

實驗3：對於獲得最大轉型效率，經增大DNA輸入量及高電壓係關鍵，但載體與插入之比率無關緊要。

藉由在保持1:3之恆定載體與插入比率的同時對含有1、2、3、4、或8微克載體DNA之400微升酵母菌懸浮液實施電穿孔來檢驗DNA量對轉型效率之影響。如實例7中所述對啤酒酵母菌進行處理。使用1、2、3、或4微克載體/比色管對400微升酵母菌細胞懸浮液(1.6×10^9個細胞/毫升)實施電穿孔(同時保持載體與插入比率=1:3)。參考圖4，72小時後測定菌落數並以(A)轉型效率(轉型體平均數/微克載體DNA±標準偏差)及(B)轉型產率(轉型體總數/比色管±標準偏差)表示。另外，(C)藉由2或2.5 kV及不同載體與插入DNA比率對400微升酵母菌懸浮液實施電穿孔。轉型效率表示為轉型體平均數/微克載體DNA。

令人感興趣地，當每次轉型使用高達4微克載體DNA時轉型效率無顯著變化，且當使用8微克載體DNA輸入量時轉型效率僅稍微降低(圖4A)。如所預期，經轉型集合庫容量之產率隨DNA輸入量增加而相應地增大(圖4B)。總而言之，使用4微克線性化載體證明是最方便有效的條件。為了探究是否可低於12微克插入DNA(以達成1:3之載體與插入比率)，測試不同的載體與插入比率。結果表明，1:1.5以上之比率對轉型效率無負面影響(圖4C)。然而，當載體與插入比率低於1:1或大於1:5時，可觀察到轉型效率降低(數據未示出)。此外，發現電穿孔電壓設置至關重要，此乃因當電穿孔電壓由2.5 kV降低至2 kV或更低時導致轉型效率顯著損失(圖4C且數據未示出)。

實例9：首次用於實驗之人類脾臟抗體集合庫多樣性及產

生性

使用本發明電穿孔製程來產生較大人類抗體集合庫。得自市售脾臟聚-A RNA之人類VH及Vκ cDNA片段係分別使用聚合酶鏈反應(PCR)及先前所報導之引物來擴增(Sblattero, D.及Bradbury, A. (1998) *Immunotechnology* 3:271-8)。將Vκ片段按比例收集在一起以使每個種系家族等同地表現於集合庫中。ScFv片段係藉由重疊PCR自VH及經收集Vκ片段分開地製備。藉由電穿孔自該等與線型載體DNA混合之scFv片段產生多個酵母菌集合庫並將其按比例收集在一起以維持所有VH種系序列之等同表現。對大量酵母菌菌落實施測序以分析scFv種系組成，且結果證實具有高多樣性。除少數VH7種系基因以外，可鑒定所有其他種系基因家族，且其表現與其在本發明集合庫中之種系基因數大致成正比(參見表8)。由於未鑒定出相同VH序列，因此據估計集合庫多樣性有95%幾率大至10^{12}(假定Vκ之最大理論多樣性為10^4且VH之多樣性為10^8(約10^8個供體B細胞))且僅受集合庫容量限制。藉由使用此高效酵母菌電穿孔製程，現在可構建容量接近典型噬菌體集合庫容量之酵母菌集合庫(Hoogenboom, H. R. (2002) *Methods Mol. Biol.* 178:1-37 ; Sblattero, D.及Bradbury, A. (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:75-80)。實際上，僅需1天即可藉由將電穿孔簡單地按比例放大至20個比色管來產生2×10^{10}酵母菌集合庫，且現在可以常規方式製備10^9酵母菌集合庫用於親和性成熟或其他優化目的。

表8：首次用於實驗之人類脾臟抗體集合庫多樣性

VH種系家族	理論分佈 (%)	首次用於實驗之人類脾臟集合庫之經觀察分佈(%) (n=347)
VH1	21	15
VH2	7	5
VH3	50	62
VH4	16	16
VH4 (DP63)	2.5	3.2
VH5	0.5	0.3
VH6	2.5	1.5
VH7	0.5	0

為證實所構建集合庫可產生具有極佳親和性之抗體，首先藉由磁性活化細胞分選針對人類腫瘤壞死因子α (TNFα)選擇人類脾臟抗體集合庫以將集合庫容量降低至約10^7個細胞、隨後基本上如先前所述實施多輪FACS(Chao, G.等人，(2006) *Nat. Protoc.* 1:755-68；Feldhaus, M. J.等人，(2003) *Nat. Biotechnol.* 21:163-70)。已確定TNFα之多種結合物且其VH係衍生自VH1、VH3及VH4且Vκ係衍生自Vκ1及Vκ2人類種系序列，此表明該集合庫實際上可由差異性抗體庫產生抗原結合物。一種scFv顯示與TNFα具有4 nM親和性且另一種顯示具有40 nM親和性。於IgG轉化後，4 nM結合物保持類似的結合親和性(1.5 nM，藉由ELISA來測定)，而40 nM結合物顯示親和性顯著升高(0.3 nM，藉由ELISA來測定)。此表觀親和性之升高可歸因於經轉化IgG與同一同源三聚TNFα蛋白質中兩個TNFα相互作用之親

合力。其他集合庫選擇亦已自該集合庫確定與人類IL-18具有低毫微莫耳親和性之抗體(數據未示出)。

藉由使用最佳電穿孔條件，吾人可以常規方式達成1×10^8個酵母菌轉型體/微克載體DNA之酵母菌轉型效率。由於該轉型效率係在最小細胞體積(100微升)中達成，因此其高度適合於自動化及多孔電穿孔裝置。舉例而言，吾人可設想，可藉由在96孔電穿孔板中實施電穿孔來達成9.6×10^9之集合庫容量。當將該多孔電穿孔以手動或自動化方式重複實施10至11次時，吾人可容易地在1天內構建大於10^{11}個轉型體之酵母菌集合庫。該效率及所構建集合庫之可能容量接近典型噬菌體集合庫，且可高度期望將使用所構建酵母菌集合庫之成功率最大化，以用於吾人可應用該集合庫之多種用途，例如酵母菌抗體展示及酵母菌雙雜交相互作用篩選。

參考文獻

1. Chao, G.等人，(2006) *Nat. Protoc.* 1:755-68.
2. Gai, S. A.及Wittrup, K. D. (2007) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17:467-73.
3. Griffiths, A. D.等人，(1994) *EMBO J.* 13:3245-60.
4. He, M.及Khan, F. (2005) *Expert Rev. Proteomics* 2:421-30.
5. Hoogenboom, H. R. (2002) *Methods Mol. Biol.* 178:1-37.
6. Hoogenboom, H. R. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1105-

16.

7. Hoet, R. M.等人，(2005) *Nat. Biotechnol.* 23:344-8.

8. Rothe, C.等人，(2008) *J. Mol. Biol.* 376:1182-200.

9. Lee, H. W.等人，(2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346:896-903.

10. Lipovsek, D.等人，(2007) *J. Mol. Biol.* 368:1024-41.

11. Segal, L.等人，(2007) *Bioinformatics* 23:i440-9.

12. Becker, D. M.及Guarente, L. (1991) *Methods Enzymol.* 194:182-7.

13. Helmuth, M.等人，(2001) *Anal. Biochem.* 293:149-52.

14. Neumann, E.等人，(1996) *Biophys. J.* 71:868-77.

15. Simon, J. R. (1993) *Methods Enzymol.* 217:478-83.

16. Suga, M.及Hatakeyama, T. (2003) *Curr. Genet.* 43:206-11.

17. Thompson, J. R.等人，(1998) *Yeast* 14:565-71.

18. Gietz, R. D.等人，(1995) *Yeast* 11:355-60.

19. Brzobohaty, B.及Kovac, L. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3089-93.

20. Weaver, J. C.等人，(1988) *FEBS Lett.* 229:30-4.

21. Sblattero, D.及Bradbury, A. (1998) *Immunotechnology* 3:271-8.

22. Sblattero, D.及Bradbury, A. (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:75-80.

23. Feldhaus, M. J.等人，(2003) *Nat. Biotechnol.* 21:163-

70.

以引用方式併入

在整個本申請案中可引用之所有引用參考文獻(包含參考文獻、專利案、專利申請案及網站)之內容皆係以引用方式明確併入本文中。除非另有說明，否則本發明之實踐可使用業內熟知之細胞電穿孔及酵母菌細胞生物學等習用技術。

等效內容

本發明可以其他具體形式來實施，而不背離其精神或基本特徵。因此，應在每個方面上皆將上述實施例視為闡釋性而非限制本文所述之本發明。因而，本發明範圍係由隨附申請專利範圍而非由上述說明書來指定，且因此本發明意欲涵蓋申請專利範圍等效內容之含義及範圍內的所有變化。

【圖式簡單說明】

當結合附圖閱讀時，根據上述較佳實施例之說明可更完全地理解本發明之前述及其他目的、特徵及優點以及本發明自身，其中：

圖1展示表1中數據之圖示，其表示菌落計數隨載體:嵌段比率及2.5 kV/公分至12.5 kV/公分之電壓而變化；

圖2展示表3中數據之圖示，其表示菌落計數隨載體:插入比率及2.5 kV/公分至12.5 kV/公分之電壓而變化；

圖3表明電穿孔效率可藉由增大每個比色管中之體積而顯著改良；及

圖4表明，經增大DNA輸入量及高電壓對於最大轉型效率至關重要，而載體與插入之比率無關緊要。

第098107048號專利申請案
中文補充序列表(101年1月)

1~2

101年1月3日 修正 補充

<110> 美商亞培公司

<120> 轉型酵母菌之方法

<130> 9161.US.01

<140> TW098107048
<141> 2009-03-03

<150> 61/067,910
<151> 2008-03-03

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成引子

<400> 1
tccaccttcc actg 14

<210> 2
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成引子

<400> 2
caggcacaca acag 14

<210> 3
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成引子

<400> 3
gagtgtcaca gagc 14

<210> 4
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成引子

<400> 4
agttccacga cacc 14

<210> 5
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之敘述：合成引子

<400> 5
gaaggtgtgc acg 13

<210> 6
<211> 13
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成引子

<400> 6
ccacgctgct gag 13

<210> 7
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成引子

<400> 7
actttgcaca ccac 14

<210> 8
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成引子

<400> 8
tttgttgccg ttgg 14

<210> 9
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成引子

<400> 9
gggaattctc acagg 15

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成引子

<400> 10
gcgccctgaa aatacaggtt ttc 23

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之敘述：合成引子

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

(103年3月17日修(更)正本

公告本

七、申請專利範圍：

1. 一種藉由酵母菌細胞之電穿孔製備酵母菌集合庫之方法，該方法包括以下步驟：

在包括0.01至1.0 M LiAc及1至100 mM DTT之溶液中培育該等酵母菌細胞，及

提供包括核酸載體、酵母菌細胞、0.1至10 M山梨醇、及0.1至10 mM $CaCl_2$或$MgCl_2$之懸浮液，及

在0.5 kV/公分至12.5 kV/公分下且以約10至約50 μF之電容下對該懸浮液實施電穿孔；從而得到容量為至少1×10^9之集合庫。

2. 如請求項1之方法，其中該懸浮液包括1 M山梨醇及1 mM $CaCl_2$。

3. 如請求項1之方法，其中該懸浮液包括1 M山梨醇及1 mM $MgCl_2$。

4. 如請求項1之方法，其中該等酵母菌細胞係在包括冷0.1 M LiAc及10 mM DTT之體積(volume)中培育。

5. 如請求項1之方法，其中在2.5 kV/公分及約25 μF之電容下對該懸浮液實施電穿孔。

6. 如請求項1之方法，其中該電穿孔步驟係在縫隙0.2公分之比色管中實施。

7. 如請求項1之方法，其中使用1微克至8微克載體DNA。

8. 如請求項1之方法，其中使用4微克載體DNA。

9. 如請求項1之方法，其中該載體呈線型。

10. 如請求項1之方法，其中該懸浮液包括400微升，其中每

毫升含1.6×10^9個酵母菌細胞(1.6×10^9 yeast cells/mL)。

11. 如請求項1之方法，其中該載體DNA與插入DNA之比率係在1:0.5至1:10範圍內。

12. 如請求項1之方法，其中該載體DNA與插入DNA之比率為1:3。

13. 一種用DNA轉型酵母菌來製備集合庫之方法，該方法包括以下步驟：

將酵母菌細胞過夜培養至約1.0至約2之OD_{600}；

在水中洗滌該等酵母菌細胞；

在包括山梨醇及$CaCl_2$之溶液中洗滌該等酵母菌細胞；

在包括0.01至1.0 M LiAc及1至100 mM DTT之溶液中培育該等酵母菌細胞；

在包括山梨醇及$CaCl_2$之溶液中洗滌該等酵母菌細胞；

將該等酵母菌細胞再懸浮於包括0.1至10 M山梨醇及0.1至10 mM $CaCl_2$之溶液中以形成酵母菌細胞電穿孔懸浮液；

將一定體積的該電穿孔細胞懸浮液添加至載體DNA及插入DNA中，形成酵母菌細胞-DNA電穿孔懸浮液；及

在介於約2.5 kV/公分與約12.5 kV/公分之間之電壓下於縫隙0.2公分之比色管中對該酵母菌細胞-DNA電穿孔懸浮液實施電穿孔。

八、圖式：

103年3月17日修(更)正本

公告本

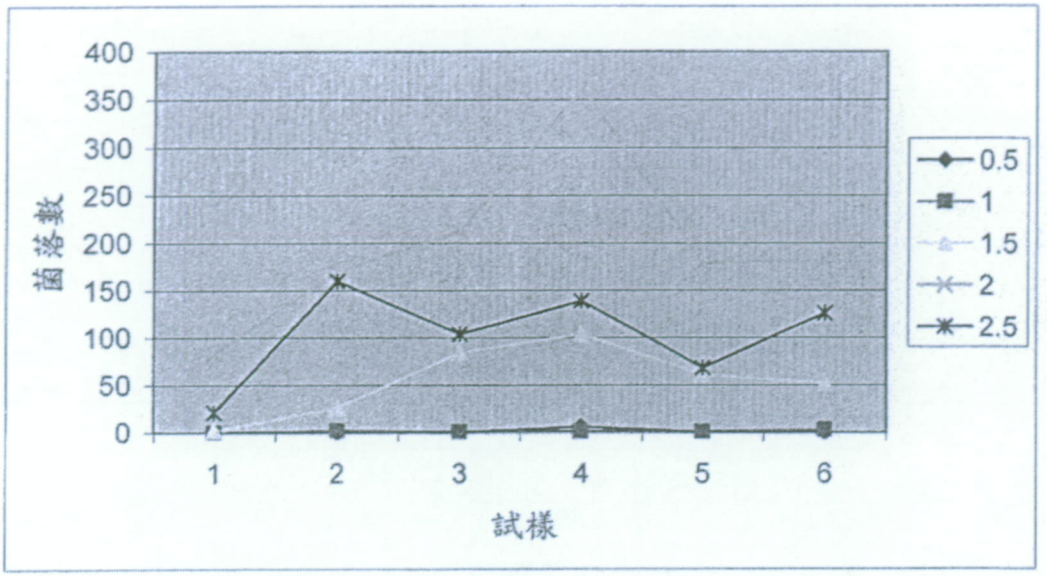


圖 1

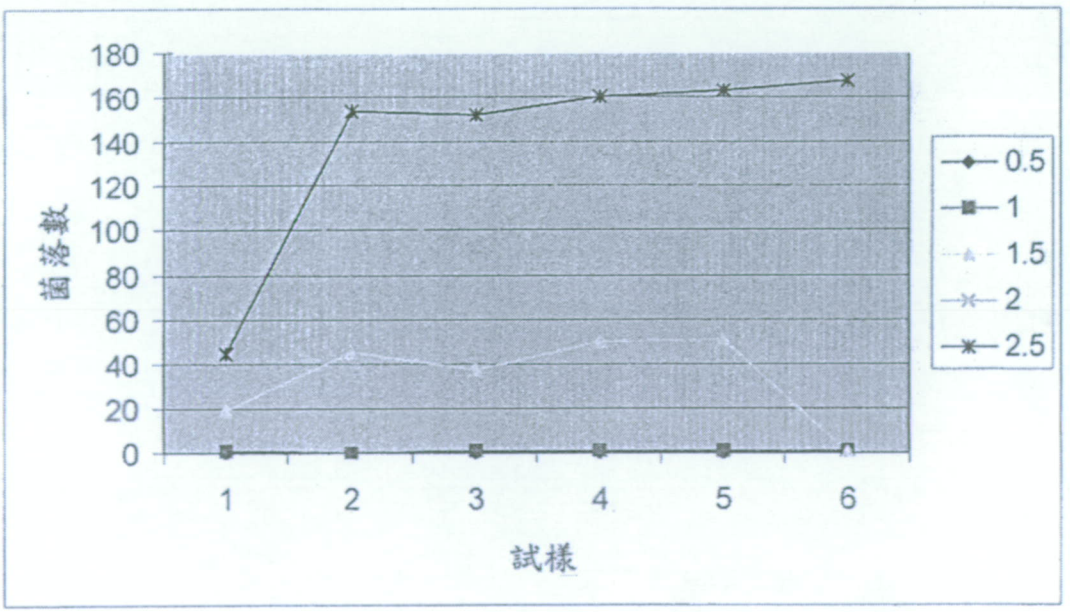


圖 2

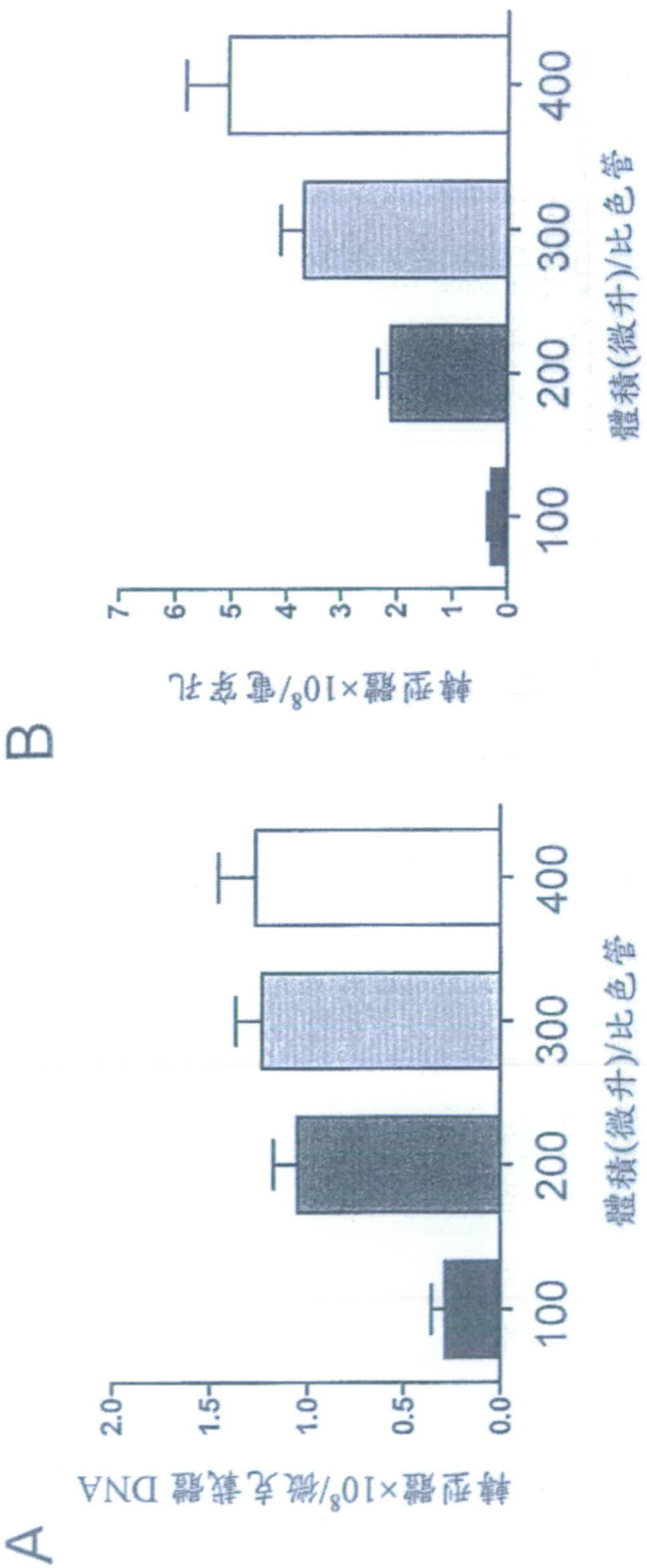

A
轉型體×10⁸/微克載體 DNA
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
100
200
300
400
體積(微升)/比色管
B
轉型體×10⁸/電穿孔
7
6
5
4
3
2
1
0
100
200
300
400
體積(微升)/比色管

圖 3

A
轉型體×10⁸/微克載體 DNA
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3
4
8
微克載體 DNA/比色管
(載體:插入=1:3)
B
轉型體×10⁸/比色管
8
6
4
2
0
1
2
3
4
8
微克載體 DNA/比色管
(載體:插入=1:3)
C
轉型體×10⁸/微克載體 DNA
2 kV
2.5 kV
1.5
1.0
0.5
0.0
1:1.5
1:2
1:2.5
1:3
載體:插入比率

圖 4